11 月 November
2020, 63(11): 1325 - 1332
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http://www.insect.org.cn
doi: 10.16380/j.kcxb.2020.11.005

狄斯瓦螨对意大利蜜蜂工蜂呼吸代谢的影响

谭 静[1], 武江利[1], 涂洋洋[1], Tessema AYNALEM[1,2], 于慧敏[1], 李南南[1], 李小英[1], 徐书法[1,*]

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 农业农村部授粉昆虫生物学重点实验室, 北京 100093;
2. College of Agriculture and Environmental Science, Bahir Dar University, P. O. Box 5501, Bahir Dar, Ethiopia)

摘要:【目的】意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*(简称"意蜂")是世界重要的授粉昆虫,对维持生态平衡、提高农产品产量和保障粮食安全至关重要。但受狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 侵害,全世界的意蜂蜂群每年都受到巨大损失。本研究主要探讨狄斯瓦螨对意蜂工蜂呼吸代谢的影响, 为今后深入研究狄斯瓦螨与意蜂之间的相互作用奠定基础。【方法】应用 SSI 多通道昆虫呼吸仪测定感染狄斯瓦螨意蜂与健康意蜂不同发育阶段(4 日龄幼虫、5 日龄蛹、新出房成蜂和 6 日龄成蜂)工蜂的耗氧量、CO_2 释放量和呼吸商,并分析其变化特征;同时采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法分析狄斯瓦螨感染意蜂与健康意蜂成年工蜂中呼吸代谢相关基因(*Coq7*, *COX* Ⅰ, *CytB*, *CytC* 和 *IF-2mt*)的表达量变化。【结果】受狄斯瓦螨侵染后,意蜂工蜂耗氧量、CO_2 释放量呈现出先上升后下降的趋势,其中耗氧量从 5 日龄蛹期的 0.0244 mL/min 下降至 6 日龄成蜂期的 0.0093 mL/min; CO_2 释放量从 5 日龄蛹期的 0.0174 mL/min 下降至 6 日龄成蜂期的 0.0040 mL/min,极显著低于同龄期健康意蜂工蜂的。健康意蜂工蜂呼吸商随其生长过程逐渐增加,至 6 日龄成蜂时呼吸商最高,达 0.9169;而狄斯瓦螨感染意蜂工蜂呼吸商则呈下降趋势,6 日龄成蜂时呼吸商最低,为 0.4424,显著低于同龄期健康成年工蜂的。实时荧光定量 PCR 结果发现,狄斯瓦螨感染意蜂成年工蜂中 *CytB* 和 *CytC* 基因的相对表达量分别是健康意蜂成年工蜂的 1.7676 和 1.9929 倍,差异显著。【结论】狄斯瓦螨侵染可直接影响意蜂工蜂的呼吸代谢,导致其正常代谢途径发生紊乱,严重破坏蜂群正常生长发育。

关键词: 意大利蜜蜂; 狄斯瓦螨; 耗氧量; CO_2 释放量; 呼吸商; 基因表达

中图分类号: Q968 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2020)11-1325-08

Effects of *Varroa destructor* on the respiratory metabolism of *Apis mellifera ligustica* workers

TAN Jing[1], WU Jiang-Li[1], TU Yang-Yang[1], Tessema AYNALEM[1,2], YU Hui-Min[1], LI Nan-Nan[1], LI Xiao-Ying[1], XU Shu-Fa[1,*] (1. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 2. College of Agriculture and Environmental Science, Bahir Dar University, P. O. Box 5501, Bahir Dar, Ethiopia)

Abstract:【Aim】The Italian honey bee, *Apis mellifera ligustica*, is one of the most economically important pollinators in the world, and plays important roles in maintaining the ecological balance, improving the output of agricultural products and ensuring food safety. However, the bee suffers from huge annual loss worldwide due to infestation of *Varroa destructor*. The purpose of this study is to

基金项目: 国家农业产业技术体系(CARS-44-KXJ-6); 国家自然科学基金项目(31902221)
作者简介: 谭静, 女, 1994 年 9 月生, 重庆市人, 硕士研究生, 研究方向为蜜蜂病理学, E-mail: tj17384769626@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xushufa@caas.cn
收稿日期 Received: 2020-03-22; 接受日期 Accepted: 2020-06-02

investigate the effects of *V. destructor* on the respiratory metabolism of *A. mellifera ligustica* workers, so as to lay a foundation for further studying the interaction between the mite and the bee. 【Methods】The oxygen consumption, CO_2 emission and respiration quotient of *V. destructor*-infected and healthy workers of *A. mellifera ligustica* at different developmental stages (4-day-old larva, 5-day-old pupa, newly emerged adult and 6-day-old adult) were measured using SSI multi-channel insect respiration instrument, and the characteristics of their changes were analyzed. Meanwhile, the expression levels of respiratory metabolism-related genes (*Coq7*, *COX* Ⅰ, *CytB*, *CytC* and *IF-2mt*) in *V. destructor*-infected and healthy adult worker bees were analyzed using real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). 【Results】The oxygen consumption and CO_2 emission of *A. mellifera ligustica* worker bees first increased and then decreased after infection by *V. destructor*. After infection by *V. destructor*, the oxygen consumption decreased from 0.0244 mL/min in the 5-day-old pupal stage of *A. mellifera ligustica* to 0.0093 mL/min in the 6-day-old adult stage, and the CO_2 emission decreased from 0.0174 mL/min in the 5-day-old pupal stage to 0.0040 mL/min in the 6-day-old adult stage, which was significantly lower than that of the healthy worker bees of the same developmental stage. The respiratory quotient of healthy worker bees of *A. mellifera ligustica* increased gradually with larval age, and reached the peak (0.9169) at the 6-day-old adult stage, while the respiratory quotient of the *V. destructor*-infected worker bees decreased, and was the lowest (0.4424) at the 6-day-old adult stage, which was significantly lower than that of the healthy worker bees of the same developmental stage. The RT-qPCR results showed that the relative expression levels of *CytB* and *CytC* genes in the *V. destructor*-infected adult worker bees of *A. mellifera ligustica* were 1.7676 and 1.9929-fold as high as those of the healthy adult worker bees, respectively. 【Conclusion】*V. destructor* infection can directly affect the respiratory metabolism of *A. mellifera ligustica* workers, leading to the disorder of their normal metabolic pathway, and seriously damaging the normal growth and development of bee colonies.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; *Varroa destructor*; oxygen consumption; CO_2 emission; respiratory quotient; gene expression

意大利蜜蜂 *Apis mellifera ligustica*(简称“意蜂”)是一种重要的经济昆虫,不仅为人类提供多种绿色健康的蜂产品,而且作为重要的授粉昆虫,每年为全球价值 2 150 亿美元的农作物进行授粉(Brittain and Potts, 2010; Gill *et al*., 2012; Smith *et al*., 2013)。近年来,全球出现的蜂群损失现象使养蜂业和依赖蜜蜂授粉的种植业受到严重威胁(Piou *et al*., 2019)。狄斯瓦螨 *Varroa destructor* 隶属节肢动物门(Arthropoda)蜱螨亚纲(Acari)寄螨总目(Parasitiformes)瓦螨科(Varroidae)(Anderson and Trueman, 2000),是威胁蜜蜂健康最为严重的致病因子,不仅可通过寄生在蜜蜂身体上消耗脂肪体来损害蜜蜂健康(Ramsey *et al*., 2019),还可通过携播病毒的方式,影响蜜蜂新陈代谢、抑制免疫及缩短寿命(Annoscia *et al*., 2012; Nazzi *et al*., 2012)。

呼吸代谢是一切生命活动的基础,通过研究昆虫呼吸代谢的变化规律,对于分析其对环境的适应性、了解代谢底物的利用情况以及评价昆虫机体的生理状态具有重要意义(Slama *et al*., 2007; DeVries and Appel, 2013; 王冬梅等, 2014; DeVries *et al*., 2015)。蜜蜂作为一种完全变态的社会性昆虫,在不同的条件下,其呼吸代谢存在不同的变化特征。Allen(1959)研究发现,出房 18 h 后的工蜂随日龄增加呼吸代谢不断升高,在 2 日龄时工蜂呼吸率最低;Jungmann 等(1989)采用瓦氏微量呼吸仪和气体分析仪分析发现,蜜蜂在静止状态下的呼吸率显著高于飞行状态;夏邦颖和郭郛(1965)利用瓦氏微量呼吸仪分析发现,生殖型个体(蜂王和雄蜂)的呼吸代谢高于非生殖型个体(工蜂);缪晓青等(2001)利用 DKW-3 型微量呼吸检压仪研究发现,意蜂工蜂蛹期呼吸商(respiratory quotient, RQ)明显高于中华蜜蜂 *Apis cerana cerana*;卢宜娟等(2008)利用华勃式微量呼吸检压仪测定发现,中华蜜蜂和意大利蜜蜂受精卵在不同发育时间其耗氧量存在明显差异,可能与受精卵内在发育机制的调控相关。目前,影响蜜蜂呼吸代谢的因素的研究多集中在温度、种类、日

龄、行为等方面，而关于在寄生虫等生物危害因子对蜜蜂呼吸代谢的影响方面研究较少，尤其是狄斯瓦螨这一重要的全球性蜜蜂寄生虫对宿主呼吸代谢的影响未见报道。本研究通过测定狄斯瓦螨侵染不同发育时期意蜂的耗氧量、CO_2 释放量和呼吸商，分析染螨后意蜂成蜂呼吸相关基因的表达量变化规律，以期明确在狄斯瓦螨侵染下意蜂呼吸代谢的变化规律，为今后深入研究狄斯瓦螨与意蜂之间的相互作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　意蜂虫源及处理

实验材料于 2019 年 8 月取自中国农业科学院蜜蜂研究所蜂场。实验分为染螨组和对照组，每组分为 3 个重复。染螨组：选取 3 群群势大小一致（同种同日龄蜂王，健康蜂群）的蜂群，通过限王产卵的方法，在蜂王产卵后将其移出。实验中，为获得准确日龄的实验用蜂，我们对相同日龄的幼虫、蛹在巢框上标记，对新出房成蜂进行蜂体标记。狄斯瓦螨取自中国农业科学院蜜蜂研究所染螨实验蜂群，参考 Dietemann 等（2013）的方法，于幼虫封盖前 1 d 接螨（每蜂群 1 头），放入健康蜂群中进行标记、观察。对意蜂工蜂 4 日龄幼虫、5 日龄蛹、新出房成蜂、出房后第 6 日成蜂分别采样，其中染螨组以观察到意蜂体有螨寄生时取样。对照组：选取 3 群群势大小一致的不接螨健康蜂群作为对照，实验方法及标记方法与染螨组相同。

1.2　意蜂呼吸代谢指标的测定

选取 4 个发育时期（4 日龄幼虫、5 日龄蛹、新出房成蜂和出房后 6 日龄成蜂）意蜂工蜂放入 SSI 多通道昆虫呼吸仪（Sable System International Inc.）的呼吸室内（图 1），恒温水箱温度控制在 34.5 ± 0.05℃。呼吸室的连接处均涂有油性物质，以保证呼吸室的密闭性，用 $CaSO_4$ 干燥剂除去从空气中进入到多通道昆虫中呼吸仪的水。调整进气流速为 90 mL/min，待整个测量装置稳定后，将待测意蜂放入呼吸室测量，每头蜜蜂测试时间为 3 min，数据通过 ExpeData 程序软件进行储存和分析。样本均实行单头测试，第一通道为空白管，用于校准基线。每个时期重复 5 次，每次测量 7 头蜜蜂。

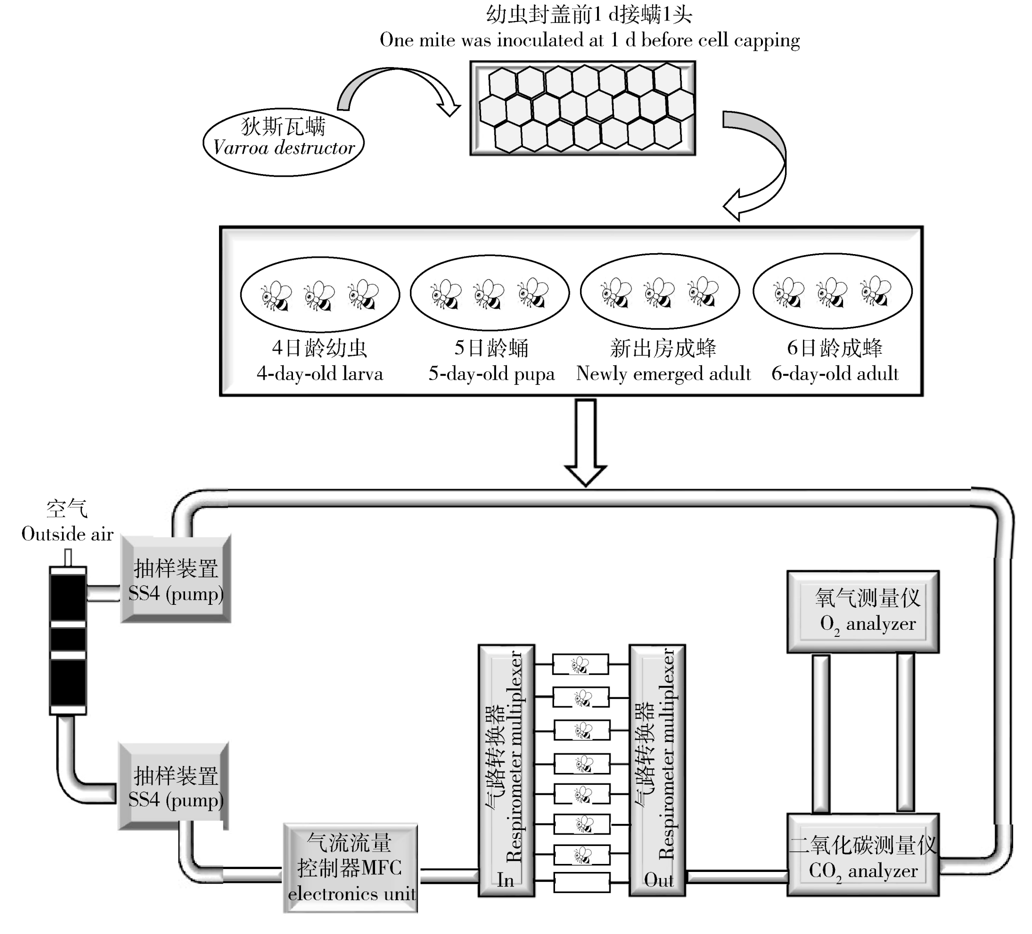


图 1　SSI 多通道蜜蜂呼吸测定示意图

Fig. 1　Schematic diagram of SSI multi-channel bee respiration measurement

1.3 呼吸代谢相关基因表达量的实时荧光定量PCR(RT-qPCR)测定

用 Trizol(Invitrogen 产品)分别提取 6 日龄染螨成年工蜂和健康成年工蜂的 RNA,随后按照第 1 链合成试剂盒 HiFiScirpt cDNA(康为世纪)的操作说明进行 cDNA 第 1 链的合成。采用 Primer Premier 5.0 设计特异性引物,分别设计 5 个呼吸相关基因的 RT-qPCR 引物(表 1),以 *β-actin* 作为内参基因。根据 SYBR FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems, KK4601)的说明配制反应体系,每个样本设 3 个重复。反应条件: 95℃ 5 min; 95℃ 3 s, 60℃ 30 s, 40 个循环;熔解程序: 95℃ 15 s, 60℃ 15 s, 95℃ 15 s, 每 0.6℃进行 1 次荧光监测。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算基因相对表达量。

表 1 RT-qPCR 所用引物信息

Table 1 Primers used in RT-qPCR

基因 Gene	正向引物(5′-3′) Forward primers	反向引物(5′-3′) Reverse primers	扩增产物长度(bp) Length of amplified product
IF-2mt	GTGGTCTTAGATTTGAAGATCCAA	TTAAAATCCTGGATCCCACTCA	110
Coq7	GACAAATGGCTGTTTTAGGTAGAA	CAGTGGGTCTTACACGATATTTTG	123
CytC	CATGAAAATACAGATTCGACAATGA	CAAATTATTGGCAAGGCGTATCT	133
CytB	TAGGAGATCCAGACAATTTCAAAA	ACTAATCCGATTACACCTCCTAATT	136
COX Ⅰ	AGCACATCACATATTTACAGTCGG	ACTTTAATTCCTGTTGGTACAGCA	96
β-actin	CAGAGGCAATCCATTCATTTTC	CCAAAAGTATCCTAGCACCCTGT	127

1.4 数据处理

使用单因素方差(ANOVA)分析不同时期染螨意蜂和健康意蜂耗氧量(mL/min)、CO_2 释放量(mL/min)和呼吸商变化,Duncan 氏多重比较分析差异显著性($P<0.05$)。利用独立样本 t 检验分析染螨成蜂与健康成蜂耗氧量、CO_2 释放量和呼吸商以及呼吸相关基因表达量的差异显著性($P<0.05$)。采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行处理。

2 结果

2.1 染螨意蜂与健康意蜂工蜂耗氧量的比较分析

染螨意蜂与健康意蜂工蜂个体平均耗氧量如图 2 所示。结果表明,在 4 日龄时,染螨意蜂与健康意蜂幼虫期耗氧量一致,均为 0.0095 mL/min。健康意蜂耗氧量从 4 日龄幼虫至出房后 6 日龄成蜂呈逐渐上升趋势,至 6 日龄成蜂时耗氧量达最大,为 0.0344 mL/min,显著高于其他时期的耗氧量($P<0.05$)。与健康意蜂不同,染螨意蜂工蜂耗氧量变化曲线为先升后降,其中 5 日龄蛹期耗氧量最高,达 0.0244 mL/min,显著高于 4 日龄幼虫、新出房成蜂和出房后 6 日龄成蜂的耗氧量($P<0.05$);随后染螨新出房意蜂耗氧量迅速降低,至 6 日龄成蜂时耗氧量最低,为 0.0093 mL/min,极显著低于健康意蜂同日龄成蜂耗氧量($P<0.01$)。

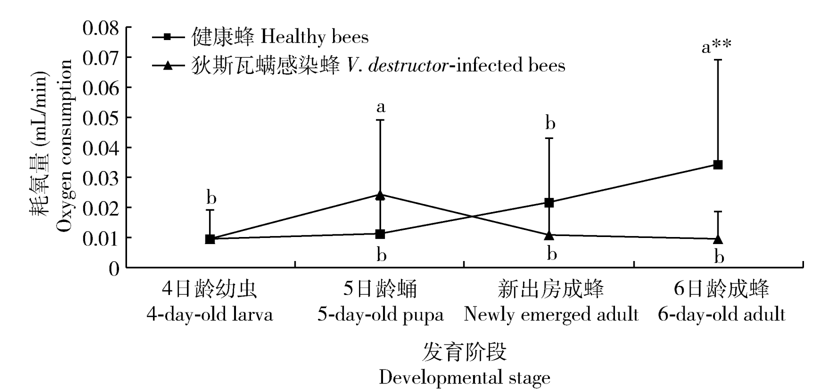


图 2 狄斯瓦螨感染的与健康的不同发育时期意蜂工蜂耗氧量的差异

Fig. 2 Difference in oxygen consumption between *Varroa destructor*-infected and healthy worker bees of *Apis mellifera ligustica* at different developmental stages

图中数据为平均值±标准差,不同字母表示相同处理不同时期间差异显著($P<0.05$, Duncan 氏多重比较);星号和双星号分别表示同一时期染螨蜂与健康蜂间差异显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)(t 检验)。Data in the figure are mean ± *SD*. Different letters indicate significant difference between different developmental stages of the same treatment ($P<0.05$, Duncan's multiple range test). The asterisk and double asterisk indicate significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) (t-test), respectively, between the mite-infected and healthy bees at the same developmental stage. 图 3 同 The same for Fig. 3.

2.2　染螨意蜂与健康意蜂工蜂 CO_2 释放量的比较分析

由图 3 可知，健康意蜂 CO_2 释放量从 4 日龄幼虫至 6 日龄成蜂呈逐渐上升趋势，至 6 日龄成蜂时 CO_2 释放量达最大，为 0.0316 mL/min，显著高于其他时期 CO_2 释放量（$P<0.05$）。与健康意蜂不同，染螨意蜂 CO_2 释放量变化特征为先升后降，5 日龄蛹期 CO_2 释放量最高，达 0.0174 mL/min，显著高于 4 日龄幼虫、新出房成蜂和 6 日龄成蜂时期的 CO_2 释放量（$P<0.05$）；染螨意蜂的 CO_2 释放量以 5 日龄蛹期为拐点，5 日龄蛹期至新出房成蜂的 CO_2 释放量迅速降低，低至 0.0053 mL/min，极显著低于同龄期健康意蜂 CO_2 释放量（$P<0.01$）；新出房成蜂与 6 日龄成蜂期比较，染螨意蜂 CO_2 释放量变化曲线下降较小，差异不显著（$P>0.05$）。与健康意蜂相比，染螨意蜂 6 日龄成蜂 CO_2 释放量极显著降低（$P<0.01$）。

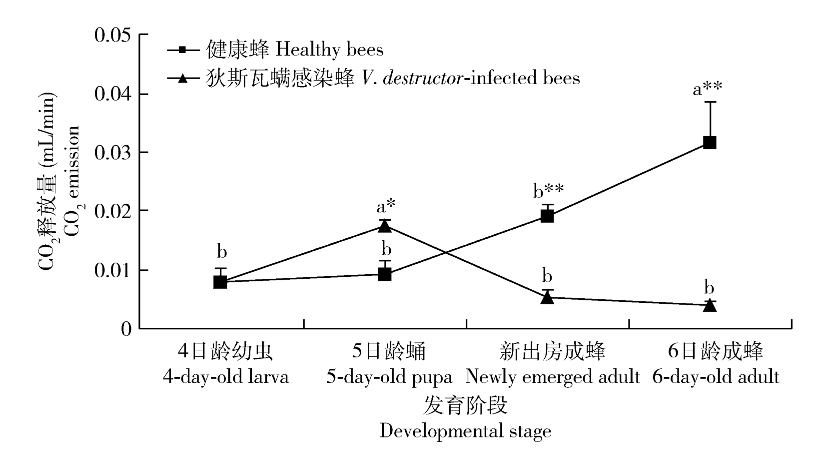


图 3　狄斯瓦螨感染的与健康的不同发育时期意蜂工蜂 CO_2 释放量的差异

Fig. 3　Difference in CO_2 emission between *Varroa destructor*-infected and healthy worker bees of *Apis mellifera ligustica* at different developmental stages

2.3　染螨意蜂与健康意蜂工蜂呼吸商的比较分析

呼吸商（RQ）是 CO_2 的释放量和 O_2 消耗量的比值，常用来判断呼吸底物性质的指标。由表 2 可知，随着意蜂的发育，健康意蜂呼吸商没有明显变化，总体呈平缓上升趋势，虽然 6 日龄成蜂时呼吸商达最高，为 0.9169，但与其他发育阶段的呼吸商相比，差异不显著（$P>0.05$）。与健康意蜂相比，染螨意蜂呼吸商呈下降变化趋势，尤其是成蜂时期，呼吸商低于 0.6，显著低于健康意蜂（$P<0.05$）。

表 2　狄斯瓦螨感染的与健康的不同发育时期意蜂工蜂的呼吸商

Table 2　Respiratory quotient of *Varroa destructor*-infected and healthy worker bees of *Apis mellifera ligustica* at different developmental stages

发育阶段 Developmental stage	呼吸商 Respiratory quotient	
	健康蜂 Healthy bees	狄斯瓦螨感染蜂 *V. destructor*-infected bees
4 日龄幼虫 4-day-old larva	0.8540 ± 0.2346 a	0.8540 ± 0.2346 a
5 日龄蛹 5-day-old pupa	0.7837 ± 0.1473 a	0.7049 ± 0.1070 a
新出房成蜂 Newly emerged adult	0.8880 ± 0.0198 a*	0.5551 ± 0.1107 a
6 日龄成蜂 6-day-old adult	0.9169 ± 0.1603 a*	0.4424 ± 0.6401 a

表中数据均为平均值 ± 标准差，同一列数据后标有小写不同字母表示同一处理不同发育阶段间存在显著性差异（$P<0.05$，Duncan 氏多重比较）；同行数据后星号表示相同发育阶段染螨蜂与健康蜂间差异显著（$P<0.05$，t 检验）。Data in the table are mean ± *SD*. Different small letters following the data in the same column indicate significant difference among different developmental stages of the same treatment（$P<0.05$, Duncan's multiple range test）, while the asterisk following the data in the same row indicates significant difference（$P<0.05$）between the mite-infected and healthy bees at the same developmental stage（t-test）.

2.4　狄斯瓦螨感染后意蜂成年工蜂呼吸代谢相关基因的表达分析

染螨成年工蜂与健康成年工蜂中 *Coq7*，*COX* Ⅰ，*CytB*，*CytC* 和 *IF-2mt* 基因的相对表达量见图 4。结果发现，染螨成年工蜂中 *Coq7*，*COX* Ⅰ，*CytB*，*CytC* 和 *IF-2mt* 基因的表达量均高于健康成

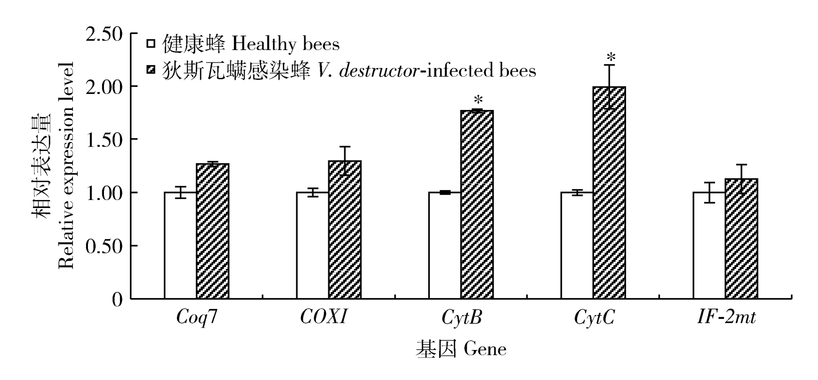


图 4 狄斯瓦螨感染的与健康意蜂成年工蜂呼吸代谢相关基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression levels of respiratory metabolism-related genes in *Varroa destructor*-infected and healthy adult worker bees of *Apis mellifera ligustica*

图中数据为平均值 ± 标准差,柱上星号表示与对照(健康成蜂)相比基因相对表达量差异显著($P<0.05$, t 检验)。Data in the figure are mean ± *SD*. The asterisk above bars indicates significant difference in the gene expression level compared with the control (healthy adult bees) ($P<0.05$, t-test).

年工蜂,且 *CytB* 和 *CytC* 的相对表达量分别是健康成年工蜂的 1.7676 和 1.9929 倍,差异达显著水平($P<0.05$)。

3 讨论

昆虫耗氧量、CO_2 释放量的测定是研究其呼吸代谢功能的一种重要指标。狄斯瓦螨作为全世界意蜂蜂群最具毁灭性的害虫之一,严重影响着意蜂生长、发育和代谢强度(秦瑶等, 2018)。研究表明,昆虫在适宜环境内呼吸代谢平稳,处于最协调状态;当受到外界压力刺激时,呼吸代谢则出现大幅度变化,昆虫可通过一系列生理活动(早熟化蛹)、生化反应(呼吸商变化、ATP 变化等)或相应的应激反应来自我调节以适应外界压力(Addo-Bediako *et al*., 2002; Martinez *et al*., 2017)。本研究结果发现,意蜂受狄斯瓦螨侵染后,其耗氧量、CO_2 释放量呈先升后降趋势,其中耗氧量从 5 日龄蛹期的 0.0244 mL/min 下降至 6 日龄成蜂期的 0.0093 mL/min,CO_2 释放量从 5 日龄蛹期的 0.0174 mL/min 下降至 6 日龄成蜂期的 0.0040 mL/min,在整个变化中可明显看到一个拐点期,即意蜂 5 日龄蛹期的耗氧量和 CO_2 释放量达到最高,显著高于健康意蜂(图 2 和 3)。这可能与狄斯瓦螨入侵宿主蛹期后导致其机体出现增强呼吸代谢的自我调节有关,由于狄斯瓦螨通常寄生于意蜂蛹发育时期,该时期最大的特点是面对外界生物侵袭时防御能力较低,此时期的蛹不需要摄取外界食物,因此蛹期的耗氧量和 CO_2 释放量达到最高,随后随着狄斯瓦螨侵染,意蜂呼吸代谢大幅下降。尽管不同外界因素对蜜蜂呼吸代谢影响的研究较多(Jungmann *et al*., 1989; 缪晓青等, 2001; 卢宜娟等, 2010),但未见涉及有害生物因子如寄生虫等对蜜蜂呼吸代谢影响的报道,本研究首次分析了受狄斯瓦螨侵染后意蜂呼吸代谢的变化规律,对今后指导蜂螨防治具有重要意义。

呼吸商作为判断昆虫代谢底物类型的重要指标,可直观反映昆虫在不同发育时期、不同环境状态下所消耗的代谢底物种类。本研究发现,健康意蜂 4 日龄幼虫呼吸商为 0.8540,5 日龄蛹呼吸商为 0.7837,6 日龄成蜂呼吸商为 0.9169(表 2)。前人研究发现,昆虫的呼吸商可反映出代谢底物类型,呼吸商在 0.71 时,呼吸代谢底物为脂类,呼吸商在 0.8 时,呼吸代谢底物为蛋白质,呼吸商在 1.0 时,呼吸代谢底物为碳水化合物(吴坤君等, 1989),根据前人的研究结果,可以推测正常发育意蜂幼虫期呼吸代谢底物主要为蛋白质,蛹期主要为脂类,成蜂期主要为碳水化合物。这种推论与意蜂生长发育时的食物供给相一致。而受狄斯瓦螨侵染后,意蜂呼吸商剧烈下降,从 5 日龄蛹期的呼吸商 0.7049 下降至 6 日龄成蜂期的 0.4424,显著低于健康意蜂(表 2),这可能与意蜂受到外界胁迫后,可通过调节呼吸代谢水平的强弱、调整代谢底物的类型等方式来提高其对环境胁迫的适应能力有关。但随着狄斯瓦螨侵染,一方面可促使 DWV 等病毒显著增殖,导致意蜂体液免疫和细胞免疫等代谢水平发生紊乱,另一方面意蜂代谢底物的大量消耗及有毒代谢物的积累,可严重破坏意蜂正常代谢途径,从而影响意蜂正常的生理生化代谢,这与 Hatjina 等(2013)、DeVries

等(2015)、钱雪等(2016)、何立志等(2017)和闫蒙云等(2018)的研究结果相近,认为当受温度、饥饿、杀虫剂等因素胁迫下,昆虫可通过改变代谢底物的类型来增强机体对不良因子的抵抗力。

研究表明,同一物种不同品种、相同品种不同状态下的昆虫其呼吸商也存在较大差异。Jungmann 等(1989)研究表明,低温下($T_a = 10℃$)休息的成蜂呼吸商为 1.01,与高温下($12.5℃ \leq T_a \leq 35℃$)活动的成蜂呼吸商差异不显著,长时间飞行的蜜蜂呼吸商显著小于 1.00。缪晓青等(2001)研究发现,中蜂工蜂蛹期呼吸商为 0.798,意蜂工蜂蛹期呼吸商为 0.846。卢宜娟等(2010)研究表明,中华蜜蜂幼虫期呼吸商为 0.838,意大利蜜蜂幼虫期为 0.870,中华蜜蜂蛹期呼吸商为 0.760,意大利蜜蜂蛹期为 0.770。与缪晓青(2001)和卢宜娟(2010)的研究比较发现,中华蜜蜂幼虫期和蛹期的呼吸商均低于意蜂,动态范围在 0.7～0.9 之间,染螨意蜂呼吸商均明显低于健康意蜂呼吸商,染螨后呼吸商急剧下降低于 0.5。因此,蜜蜂呼吸商低于 0.5 时,可作为科学评价其受外界危害程度的一个阈值。本实验对染螨条件下参与意蜂呼吸代谢的 5 个侯选基因(*Coq7*, *COX* Ⅰ, *CytB*, *CytC* 和 *IF-2mt*)的表达特性进行了初步研究。其中 Coq7(也称为 mclk-1)是一种羟化酶(coq7p),参与辅酶(CoQ)合成途径的最后一步(Acosta *et al*., 2016);核编码线粒体翻译起始因子 2(IF-2mt),是线粒体蛋白质合成的一种关键调节酶;线粒体编码的细胞色素 C 氧化酶亚基Ⅰ(COXⅠ),是细胞色素 C 氧化酶(复合物Ⅳ)的催化亚单位之一,呼吸链的末端酶,可将电子从 CytC 上转移到 O_2(Corona *et al*., 2005)。细胞色素 C 存在于线粒体内膜上,作为呼吸链的重要一员,影响 ATP 的产生。细胞色素 B(CytB)、细胞色素 C(CytC)为生命体内氧化还原链上重要的电子传递体,在哺乳动物细胞中,细胞色素 C 从线粒体释放到胞质中是起始凋亡途径的关键一步,被认为是线粒体凋亡途径的重要标志(Liu *et al*., 2007)。本研究发现,受狄斯瓦螨侵染后,意蜂成年工蜂中与呼吸相关侯选基因的表达量均高于健康成蜂(图 4),这与前人的报道(Navarro *et al*., 2002)相似。意蜂从蛹期至成蜂期呼吸商降低,其与呼吸相关基因的表达却明显提高,其中 *CytB* 和 *CytC* 基因在染螨前后表达差异显著(图 4),推测受狄斯瓦螨侵染后,意蜂机体呼吸代谢受到较大影响,初期可通过调节呼吸和消耗代谢底物(脂类)进行适应性防御,但随着代谢底物的大量消耗,最终导致染螨后意蜂成蜂代谢紊乱、寿命缩短,这与 Bowen-Walker 和 Gunn(2001)和 Ramsey 等(2019)研究结果相似。

本研究仅对染螨条件下意蜂的呼吸代谢进行了初步研究,今后应进一步研究在狄斯瓦螨侵染过程中,与意蜂呼吸相关基因所涉及代谢途径的调控机制,以及蜜蜂机体在适应调节及应激条件下,与呼吸代谢相关因子表达规律及细胞传导途径,对今后开展蜜蜂与寄生螨之间的互作研究奠定基础,为有效防控螨害提供依据。

参考文献(References)

Acosta MJ, Fonseca LV, Desbats MA, Cerqua C, Zordan R, Trevisson E, Salviati L, 2016. Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg*., 1857(8): 1079–1085.

Addo-Bediako A, Chown SL, Gaston KJ, 2002. Metabolic cold adaptation in insects: a large-scale perspective. *Funct. Ecol*., 16(3): 332–338.

Allen MD, 1959. Respiration rates of worker honeybees of different ages and at different temperatures. *J. Exp. Biol*., 36(1): 92–101.

Anderson DL, Trueman JWH, 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp. Appl. Acarol*., 24(3): 165–189.

Annoscia D, Del Piccolo F, Nazzi F, 2012. How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrcarbons and water loss in infested honeybees. *J. Insect Physiol*., 58(12): 1548–1555.

Bowen-Walker PL, Gunn A, 2001. The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomol. Exp. Appl*., 101(3): 207–217.

Brittain C, Potts SG, 2010. The potential impacts of insecticides on the life-history traits of bees and the consequences for pollination. *Basic Appl. Ecol*., 12(4): 321–331.

Corona M, Hughes KA, Weaver DB, Robinson GE, 2005. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mech. Ageing Dev*., 126(11): 1230–1238.

DeVries ZC, Appel AG, 2013. Standard metabolic rates of *Lepisma saccharina* and *Thermobia domestica*: effects of temperature and mass. *J. Insect Physiol*., 59(6): 638–645.

DeVries ZC, Kells SA, Appel AG, 2015. Effects of starvation and molting on the metabolic rate of the bed bug (*Cimex lectularius* L.). *Physiol. Biochem. Zool*., 88(1): 53–65.

Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, Wauquiez Q, Tannahill C, Frey E, Ziegelmann B, Rosenkranz P, Ellis JD, 2013. Standard methods for varroa research. *J. Apic. Res*., 52(1): 1–54.

Gill RJ, Ramos-Rodriguez O, Raine NE, 2012. Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees.

Nature, 491(7422): 105 - 108.

Hatjina F, Papaefthimiou C, Charistos L, Dogaroglu T, Bouga M, Emmanouil C, Arnold G, 2013. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees *in vivo*. *Apidologie*, 44(4): 467 - 480.

He LZ, Liu YP, Yan MY, Liu Q, Li ZW, Ji R, Ye XF, 2017. The respiratory metabolism of overwintering *Gomphocerus sibiricus* (Orthoptera: Acrididae) eggs. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 54(1): 92 - 99. [何立志, 刘余平, 闫蒙云, 刘琼, 李占武, 季荣, 叶小芳, 2017. 西伯利亚蝗越冬卵的呼吸代谢规律研究. 应用昆虫学报, 54(1): 92 - 99]

Jungmann R, Rothe U, Nachtigall W, 1989. Flight of the honey bee. *J. Comp. Physiol. B*, 158(6): 739 - 749.

Liu L, Peng J, Liu K, Yang H, Li Y, Hong H, 2007. Influence of cytochrome c on apoptosis induced by *Anagrapha* (*Syngrapha*) *falcifera* multiple nuclear polyhedrosis virus (AfMNPV) in insect *Spodoptera litura* cells. *Cell Biol. Int.*, 31(9): 996 - 1001.

Lu YJ, Wang AP, Liao T, Wu ZH, Miao XQ, 2008. Research on respiratory metabolism of fertilized eggs of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Apic. China*, 59(5): 5 - 7. [卢宜娟, 王安平, 廖婷, 吴珍红, 缪晓青, 2008. 中华蜜蜂和意大利蜜蜂受精卵呼吸代谢的研究. 中国蜂业, 59(5): 5 - 7]

Lu YJ, Yang WC, Wang AP, Wu ZH, Miao XQ, 2010. Research on respiratory metabolism of larvae and pupae of worker honeybee of *Apis cerana cerana* and *Apis mellifera ligustica*. *Apic. China*, (7): 5 - 8. [卢宜娟, 杨文超, 王安平, 吴珍红, 缪晓青, 2010. 中华蜜蜂和意大利蜜蜂工蜂幼虫和蛹呼吸代谢的研究. 中国蜂业, (7): 5 - 8]

Martinez E, Menze MA, Agosta SJ, 2017. Reduced mitochondrial efficiency explains mismatched growth and metabolic rate at supraoptimal temperatures. *Physiol. Biochem. Zool.*, 90 (2): 294 - 298.

Miao XQ, Zhang QK, Wu ZH, Fu ZM, Wang JD, 2001. Comparison of respiratory metabolism between Italian and Chinese worker bees during pupal stage. *J. Fujian Agric. Univ.*, 30(4): 524 - 527. [缪晓青, 张其康, 吴珍红, 傅中民, 王建鼎, 2001. 中蜂和意蜂工蜂蛹期呼吸代谢的比较. 福建农业大学学报, 30(4): 524 - 527]

Navarro A, Sánchez Del Pino MJ, Gómez C, Peralta JL, Boveris A, 2002. Behavioral dysfunction, brain oxidative stress, and impaired mitochondrial electron transfer in aging mice. *Am. J. Physiol. Regul., Integr. Comp. Physiol.*, 282(4): R985 - R992.

Nazzi F, Brown SP, Annoscia D, Del Piccolo F, Di Prisco G, Varricchio P, Della Vedova G, Cattonaro F, Caprio E, Pennacchio F, 2012. Synergistic parasite-pathogen interactions mediated by host immunity can drive the collapse of honeybee colonies. *PLoS Pathog.*, 8(6): e1002735.

Piou V, Urrutia V, Laffont C, Hemptinne JL, Vétillard A, 2019. The nature of the arena surface affects the outcome of host-finding behavior bioassays in *Varroa destructor* (Anderson & Trueman). *Parasitol. Res.*, 118(10): 2935 - 2943.

Qian X, Wang DM, Li S, Dou J, Ji R, 2016. Seasonal variation in respiratory metabolism and its adaptive value in *Pyrrhocoris apterus*. *Acta Ecol. Sin.*, 36(20): 6602 - 6606. [钱雪, 王冬梅, 李爽, 窦洁, 季荣, 2016. 始红蝽呼吸代谢的季节变化及对温度的适应性. 生态学报, 36(20): 6602 - 6606]

Qin Y, Lin ZG, Hu FL, Zheng HQ, 2018. The parasite-host relationship between *Varroa destructor* and honeybees. *J. Environ. Entomol.*, 40(4): 825 - 833. [秦瑶, 蔺哲广, 胡福良, 郑火青, 2018. 狄斯瓦螨与蜜蜂的寄生关系. 环境昆虫学报, 40(4): 825 - 833]

Ramsey SD, Ochoa R, Bauchan G, Gulbronson C, Mowery JD, Cohen A, Lim D, Joklik J, Cicero JM, Ellis JD, 2019. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116(5): 1792 - 1801.

Slama K, Sobotnik J, Hanus R, 2007. Respiratory concerts revealed by scanning microrespirography in a termite *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Insect Physiol.*, 53(4): 295 - 311.

Smith KM, Loh EH, Rostal MK, Rostal MK, Zambrana-Torrelio CM, Mendiola L, Daszak P, 2013. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. *EcoHealth*, 10(4): 434 - 445.

Wang DM, Li J, Li S, Hu HX, Ji R, 2014. Effects of temperature on the respiratory metabolism of *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae). *Acta Entomol. Sin.*, 57(3): 373 - 378. [王冬梅, 李娟, 李爽, 扈鸿霞, 季荣, 2014. 温度对意大利蝗呼吸代谢的影响. 昆虫学报, 57(3): 373 - 378]

Wu KJ, Gong PY, Li XZ, 1989. Characteristics of the respiratory metabolism of overwintering pupa of the cotton bollworm, *Heliothis armigera*. *Acta Entomol. Sin.*, 32(2): 136 - 143. [吴坤君, 龚佩瑜, 李秀珍, 1989. 棉铃虫越冬蛹呼吸代谢的某些特点. 昆虫学报, 32(2): 136 - 143]

Xia BY, Guo F, 1965. Respiratory metabolism during pupal stage of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Acta Entomol. Sin.*, 14(5): 441 - 445. [夏邦颖, 郭郛, 1965. 蜜蜂(*Apis mellifera* L.)蛹期呼吸代谢的测定. 昆虫学报, 14(5): 441 - 445]

Yan MY, Xu Y, Wang XX, Wang H, Ji R, Ye XF, 2018. The response of respiratory metabolism in overwintering eggs of Italian locust *Calliptamus italicus* (Orthoptera: Acrididae) to seasonal changes. *J. Plant Prot.*, 45(6): 1302 - 1307. [闫蒙云, 徐叶, 王香香, 王晗, 季荣, 叶小芳, 2018. 意大利蝗卵越冬期呼吸代谢对季节变化的响应. 植物保护学报, 45(6): 1302 - 1307]

(责任编辑: 赵利辉)